Untersuchungen zur Transsudationsfähigkeit der menschlichen Nasenschleimhaut durch Bestimmung von Intermediärstoffwechselenzymen in Nasensekret und Serum bei verschiedenen inneren Erkrankungen

Verena Maria Waldmann

1976

Aus dem biochemischen Laboratorium
der Hals–Nasen–Ohren-Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H.H. Naumann

Untersuchungen zur Transsudationsfähigkeit der menschlichen Nasenschleimhaut durch Bestimmung von Intermediärstoffwechselenzymen in Nasensekret und Serum bei verschiedenen inneren Erkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Verena Maria Waldmann
aus München

1976

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
Referent: Prof. Dr. rer. nat. K. Hochstrasser
Korreferent: Prof. Dr. med. H. H. Naumann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

AP	alkalische Phosphatase
α-HBDH	α - Hydroxybutyrat - Dehydrogenase
CPK	Kreatin - Phosphokinase
GLDH	Glutamatdehydrigenase
GOT	Glutamat - Oxalacetat - Transaminase
GPT	Glutamat - Pyruvat - Transaminase
LAP	Leucin - Aminopeptidase
LDH	Lactat - Dehydrogenase
NAD	Nikotinamid - Adenin - Dinucleotid
NADH	reduziertes Nikotinamid - Adenin - Dinucleotid
SP	saure Phosphatase

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
A. Einleitung	1
B. Theoretischer Teil	4
I. Vorbemerkung	4
II. Photometrische Tests zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Enzymen in Serum und Nasensekret	4
1. LDH	5
2. GOT	6
3. GPT	6
4. CPK	7
5. α-HBDH	8
6. Alkalische Phosphatase	10
7. Saure Phosphatase	10
8. LAP	12
9. GLDH	12
III. Immunologische Albuminbestimmung des Nasensekrets zur quantitativen Enzymanalyse	14
C. Ergebnisse	17
I. Kurz zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse von Abb. I - IX mit Werten der Einzelmessungen	17

Seite

1. LDH 17
2. GOT 18
3. GPT 18
4. CPK 19
5. α-HBDH 20
6. Alkalische Phosphatase 20
7. Saure Phosphatase 21
8. LAP 22
9. GLDH 22

II. Kurz zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse von Abb. X - XIII mit Werten der Einzelmessungen 23

III. Graphische Darstellung der Meßergebnisse in Abb. I - XIII 26

D. Diskussion 33

E. Experimenteller Teil 37

I. Sekretentnahme 37

II. Blutentnahme 37

III. Bestimmung der Enzymaktivitäten in Nasensekret und Serum 37

1. LDH 38
2. GOT 38
3. GPT 39
4. CPK 39

Seite

5. α-HBDH 40
6. Alkalische Phosphatase 40
7. Saure Phosphatase 41
8. LAP 42
9. GLDH 42

IV. Auftragen des Sekreteluats auf M - Partigen - Albumin - Immundiffusions - Platten 43

V. Aufstellung der Eichkurve zur quantitativen Albuminbestimmung 44

F. Zusammenfassung 47

G. Literaturverzeichnis 49

A. Einleitung

Über die Resorptionsfähigkeit der menschlichen Nasenschleimhaut für nieder- und hochmolekulare bzw. für korpuskuläre Stoffe liegen bereits umfangreiche Untersuchungen vor (1 - 6). Es sind die Aufnahmewege und -arten für gasförmige Stoffe, Lösungen und feste Stoffe verschiedenster Art bekannt. Die Nasenschleimhaut ist außerdem permeabel für bestimmte Ionen und Lösungen von Dextranen (7). Sie sezerniert (8) jedoch auch spezifische Substanzen durch die Tätigkeit bestimmter Drüsen und Drüsenzellen. Die Meinungen, ob und in welchem Umfang Transsudationsvorgänge bei der Sekretbildung eine Rolle spielen, gehen trotz umfangreicher Untersuchungen weitgehend auseinander.

Sternberg (9) nimmt an, daß das Sekret der Nase aus den Drüsen und Becherzellen stamme und besonders durch Transsudationsvorgänge produziert werde. Er betrachtet die Schleimhaut und das darunterliegende Gewebe als kolloidale Membran, wodurch es, da der Druck im Gewebe größer ist als an der Oberfläche, zu einem Austritt von Flüssigkeit aus dem Gewebe kommt. Ein Versuch Messerklingers, zum experimentellen Beweis einer Transsudation, den Weg von der Blutbahn zur Schleimhautoberfläche mit körperfremder Substanz, nämlich Farbstoff, zu makieren, brachte kein positives Ergebnis. Ebenso ließ sich mit der Fluorochromierungsmethode von Haitinger, mit der das Albumin des Blutplasmas selektiv angefärbt wird, kein Nachweis für eine Transsudation erbringen. Das Albumin konnte nur in Becherzellen, Drüsen und Sekret nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Flimmerzellen. Auch Ingelstedt und Ivstam

(10) konnten nach intravenöser Applikation von Fluorescin beweisen, daß dieser Stoff unter physiologischen Bedingungen nicht im Nasensekret erscheint. Daraus konnte gefolgert werden, daß einer Transsudation bei der Sekretbildung entweder keine oder nur eine geringe Bedeutung zukommt.

Es ist seit langem bekannt, daß verschiedene Serumbestandteile im Nasensekret vorhanden sind, doch ist nicht erwiesen, daß diese auf dem Weg der Transsudation durch die Nasenschleimhaut in das Sekret gelangen. Die immunelektrophoretische Analyse des Nasensekrets ergibt, daß mehr oder weniger alle Serumproteine in ähnlichen Relationen auch im Nasensekret vorkommen. Die Gesamtmenge des sezernierten Serumeiweißes variiert jedoch stark.

Es wurde deshalb nach einer Möglichkeit gesucht, mit modernen analytischen Methoden eine eventuelle Transsudationstätigkeit der Nasenschleimhaut nachweisen zu können.

In der Inneren Medizin werden im Serum vorkommende, leicht bestimmbare Enzyme des Intermediärstoffwechsels zur Diagnostik verschiedener Erkrankungen routinemäßig verwendet (11). Da eine Enzymbestimmung bereits in bestimmten Punktionsflüssigkeiten des menschlichen Organismusses gelangt, trat als erstes die Frage auf, ob Enzyme des Intermediärstoffwechsels auch im Nasensekret vorkommen und als zweites, in welcher Kozentration sie vorhanden sind. Im Rahmen dieser Dissertation sollen bei einem Kollektiv von Patienten ohne patologische Veränderung im Bereich der Nase, der Nasennebenhöhlen und der oberen Luftwege das Vorhandensein dieser Serumenzyme und deren Normwert im Nasensekret bestimmt werden. Es

sind die Enzyme LDH, GOT, GPT, CPK, α-HBDH, alkalische und saure Phosphatase, LAP und GLDH. Im Anschluß soll bei Patienten mit bestimmten internen Erkrankungen, bei denen man extrem hohe Spiegel von Enzymen des Intermediärstoffwechsels im Serum findet, in einer Vergleichsuntersuchung die Enzymaktivität sowohl im Nasensekret wie auch im Serum festgestellt werden, um somit Rückschlüsse ziehen zu können, ob die Enzyme im Nasensekret eine Produktion der Nasenschleimhaut selbst sind, oder aber durch Transsudation vom Serum in das Sekret gelangen. Beim Vorhandensein einer wesentlichen Transsudationsfähigkeit der Nasenschleimhaut müßte sich eine simultane Konzentrationserhöhung der wirkungsgleichen Enzyme im Nasensekret feststellen lassen.

B. Theoretischer Teil

I. Vorbemerkung

Die Geschichte der diagnostischen Enzymologie begann am Anfang dieses Jahrhunderts mit der Entdeckung der Vermehrung der Diastase in Harn und Blutserum bei der akuten Pankreasnekrose im Jahre 1908 (Wohlgemuth). Zur selben Zeit wurden die ersten Vermutungen laut, daß "angeborene Stoffwechselstörungen" durch Enzymdefekte bedingt seien. Durch die Erkenntnis der Erhöhung der Aspartataminotransferase beim Herzinfarkt Mitte des Jahrhunderts konnte gezeigt werden, daß auch umschriebene Schädigungen eines relativ kleinen Organs zu gut meßbaren Enzymerhöhungen im Serum führen. Enzyme können aufgrund ihrer katalytischen Funktion mit außerordentlich hoher Empfindlichkeit bestimmt werden. Aufgrund dieser Tatsache ist die Enzymologie heute zum wesentlichen Bestandteil der Diagnostik in der Inneren Medizin geworden.

Es lassen sich jedoch Enzyme nicht nur im Serum, sondern auch in anderen Körperflüssigkeiten nachweisen. In dieser Arbeit soll eine sowohl qualitative wie auch quantitative Bestimmung bestimmter Enzyme im Nasensekret durchgeführt werden.

II. Photometrische Tests zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Enzymen in Serum und Nasensekret

1. LDH

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Die LDH weist keine charakteristische Verteilung auf bestimmte Strukturen des Körpers auf. Sie ist, da es sich um ein Enzym der Glykose handelt, in allen Organen in mäßiger Aktivität vorhanden, besonders jedoch in Leber, Herz, Niere und Skelettmuskulatur. Genaue Differenzierungsmöglichkeiten ergeben sich aus der Bestimmung der Isoenzyme. Die Aufgabe der LDH ist die Einstellung eines, den physiologischen Bedingungen entsprechenden Pyruvat - Lactat - Gleichgewichtes, wobei unter anaeroben Verhältnissen Lactat gebildet, unter aeroben Pyruvat zur Veratmung bereitgestellt wird. Klinisch läßt sich eine Erhöhung der LDH besonders nach Herzinfarkten feststellen.

b) Bestimmung

Die Bestimmung der LDH geht auf den optischen Test nach Warburg und Christian zurück. Die Lactat - Dehydrogenase katalysiert die letzte Stufe der anaeroben Glykolyse. Es wird dabei Lactat in Gegenwart von NAD in Pyruvat umgewandelt. Die dabei entstehende $NADH_2$ kann photometrisch als Extinktionsänderung pro Minute bestimmt werden und gilt als Maß für die gesuchte Enzymaktivität.

c) Reaktionsprinzip

$$\text{Lactat} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvat} + \text{NADH}_2$$

2. GOT

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Die Transaminase GOT ist in den meisten Geweben zu finden. Leber, Herz und Skelettmuskulatur enthalten jedoch den Hauptanteil, sowohl intrazytoplasmatisch wie intramitochondrial. Aufgrund der unterschiedlichen intrazellulären Verteilung können Aussagen über den Schädigungsgrad der Parenchymzelle gemacht werden. Ein starker Anstieg der GOT ist meßbar, besonders bei einer akuten Virus - Hepatitis.

b) Bestimmung

Die GOT katalysiert im Proteinstoffwechsel die Übertragung der Aminogruppe von Aspartat auf α - Ketoglutarat. In reversibler Reaktion entstehen Oxalacetat und Glutamat. Oxalacetat oxydiert unter Katalyse der MDH das $NADH_2$. Meßgröße für die vorhandelne GOT - Menge im Testansatz ist die Abnahme der $NADH_2$ - Konzentration pro Zeiteinheit.

c) Reaktionsprinzip

$$\text{Aspartat} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{Oxalacetat} + \text{Glutamat}$$

$$\text{Oxalacetat} + NADH_2 \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Malat} + NAD$$

3. GPT

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Das Enzym GPT findet sich im Zytoplasma aller Gewebezellen, hauptsächlich in denen der Leber. Sie ist im Gegensatz zur GOT ausschließlich im Zytoplasma vorhanden. Auch die GPT ist wie die GOT bei einer Virus - Hepatitis stark erhöht. Der De - Ritis - Quotient $\frac{GOT}{GPT}$ ist ein Maß für den jeweiligen Schädigungsgrad der Zelle. Er nimmt ab bei einer akuten Entzündung als Ausdruck einer gesteigerten GPT - Ausschüttung, steigt an durch den zusätzlichen Austritt mitochondrialer GOT bei verstärkter Zellschädigung.

b) Bestimmung

Die Transaminase GPT katalysiert die reversible Übertragung der Aminogruppe von Alanin auf α- Ketoglutarat. Es entstehen Glutamat und Pyruvat. Das Pyruvat oxydiert $NADH_2$ unter der katalytischen Wirkung von LDH. Meßgröße für die vorhandene GPT - Menge im Testansatz ist die Abnahme der $NADH_2$ - Konzentration pro Zeiteinheit.

c) Reaktionsprinzip

$$\text{Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightarrow{GPT} \text{Pyruvat} + \text{Glutamat}$$

$$\text{Pyruvat} + NADH_2 \xrightarrow{LDH} \text{Lactat} + NAD$$

4. CPK

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Als spezifisches Enzym der Herz- und Skelettmuskulaturen ist die Creatinkinase vorwiegend

in diesen Organen enthalten, kommt daneben in relativ hoher Konzentration im Gehirn vor. Eine Erhöhung der CPK ist meßbar innerhalb der ersten drei Tage nach Herzinfarkt. Eine erhöhte Serumaktivität ermöglicht immer eine spezifische Aussage für eine Herz- oder Skelettmuskelschädigung.

b) Bestimmung

Die CPK ermöglicht die reversible Phosphatübertragung von ATP auf Creatin. Durch katalytische Wirkung einer Hexokinase wird der Phosphatrest auf Glukose übertragen. Das Glukose - 6 - Phosphat steht zur Reduktion von NAD zur Verfügung. Es entstehen unter Katalyse von G - 6 - PDH 6 - Phosphoglukonat und $NADH_2$. Das am Ende gebildete $NADH_2$ ist dem in der Primärreaktion entstandenen ATP proportional; damit ist die $NADH_2$ - Zunahme ein Maß für die gesuchte CPK - Aktivität.

c) Reaktionsprinzip

$$\text{Kreatinphosphat} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CPK}} \text{Kreatin} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{Glukose} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{ADP} + \text{Glukose - 6 - Phosphat}$$

$$\text{Glukose - 6 - Phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6 - Phospho - Glukonat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

5. α - HBDH

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Das Verteilungsmuster der LDH - Iso - Enzym in den verschiedenen Organen steht in Beziehung zu deren Sauerstoffversorgung. Gewebe mit anaerober Energiegewinnung wie Muskel und Leber enthalten hauptsächlich LDH - 5 - Iso, gut mit Sauerstoff versorgte Gewebe wie das Herz hauptsächlich LDH - 1 - Isoenzyme. So hat bei pathologischer Membranschädigung der Zellen neben der Bestimmung der Gesamtaktivität der LDH im Serum die Erfassung der einzelnen LDH - Isoenzym - Banden erhebliche diagnostische Bedeutung erlangt. Elektrophoretisch läßt scih die LDH in 5 Isoenzyme auftrennen, wobei LDH_1 das am weitesten von der Kathode zur Anode wandernde Isoenzym ist, und LDH_5 am nächsten zur Kathode liegt. Die HBDH, die als LDH - Teilfraktion die Aktivitäten der Isoenzyme LDH_1 und LDH_2 erfaßt, ist vorwiegend im Herzmuskel, den Erythozyten und Nieren zu finden. Die Bestimmung der α - HBDH ist aufgrund der organspezifischen LDH - Isoenzym - Verteilung zur Diagnostik von Myocardinfarkt und Bluterkrankungen geeignet. Der Quotient $\frac{HBDH}{LDH}$ steigt bei Herzmuskelnekrosen deutlich an, sinkt jedoch bei Leberbeteiligung, da hier der Anteil des Isoenzyms LDH_5 überwiegt.

b) Bestimmung

Unter der katalytischen Wirkung der HBDH erfolgt die Rduktion des α - Ketobutyrats zu α - Hydroxybutyrat. Die gemessene Konzentrationsabnahme an $NADH_2$ pro Minute gilt als Maß für die gesuchte Enzymaktivität.

c) Reaktionsprinzip

$$\alpha\text{ - Ketobutyrat} + NADH_2 \xrightarrow{HBDH} \alpha\text{ - Hydroxybutyrat} + NAD$$

6. Alkalische Phosphatase

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Die alkalische Phosphatase kommt in hohen Konzentrationen in der Leber und den Osteoblasten des Knochens vor. Erhöhte Enzymaktivitäten im Serum treten bei verstärkter Osteoblastentätigkeit un allen Formen der Cholestase auf. Beim Verschluß - Ikterus zeigt sich starker Anstieg der alkalischen Phosphatase bei jedoch nur geringem Anstieg der Transaminasen.

b) Bestimmung

p - Nitrophenylphosphat wird durch Phosphatasen in Phosphat und p - Nitrophenol gespalten. Die nach einer gewissen Zeit freigesetzte p - Nitrophenol - Menge ist proportional der Phosphatase - Aktivität und kann nach Zugabe von Natronlauge aufgrund seiner gelben Farbe bei 405 nm bestimmt werden. Die Zunahme der Extinktion pro Zeiteinheit ist der Enzymaktivität direkt proportional.

c) Reaktionsprinzip

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} + H_2O \xrightarrow{AP} \text{p-Nitrophenol} + \text{Phosphat}$$

7. Saure Phosphatase

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Die saure Phosphatase kommt in hoher Konzentration in der Prostata des Erwachsenen vor. Sie ist ein lysosomales Enzym und dient zur intrazellulären Verdauung von pinozytierten und funktionslos gewordenen Zellbestandteilen. Formaldehyd bewirkt eine starke Hemmung der Erytrozyten und eine geringe Hemmung der Serumphosphatase. Prostataphosphatase wird durch Formaldehyd nicht gehemmt. Umgekehrt hemmt e - Tartrat die Prostata, nicht aber die in den Erythrozyten und im Serum vorhandenen sauren Phosphatasen.

b) Bestimmung

p - Nitrophenylphosphat wird durch Phosphatasen in Phospht und p - Nitrophenol gespalten. Es kann jedoch nicht wie bei der alkalischen Phosphatase direkt die Zunahme von p - Nitrophenol gemessen werden, da sich die Absorptionskurve dieses Produktes im sauren pH - Bereich nicht von derjenigen des Substrates unterscheidet. Die Enzymreaktion wird bei saurem pH durchgeführt und durch Zusatz von NaOH unterbrochen. Dadurch wird das im sauren pH - Bereich ungefärbt vorliegende p - Nitrophenol in das gelbgefärbte p - Nitrophenolat umgewandelt. Die während der Inkubation freigesetzte p - Nitrophenol - Menge ist proportional der Aktivität der sauren Phosphatase.

c) Reaktionsprinzip

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} \xrightarrow{SP} \text{p-Nitrophenol} + P$$

$$\text{p-Nitrophenol} + NaOH \longrightarrow \text{p-Nitrophenolat} + H_2O$$

8. LAP

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Die LAP ist eine Aminopeptidase, der man eine Präferenz für Leucin zuschreibt. Sie läßt sich in fast allen tierischen sowie in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten in unterschiedlicher Konzentration nachweisen. Sowohl extrahepatisch bedingte Gallenabflußbehinderungen durch Konkremente und Tumore, als auch intrahepatisch verursachte Cholestasen benigner und maligner Natur gehen mit erhöhter LAP - Aktivität im Serum einher.

b) Bestimmung

L - Leucin - Nitranilid dient als Substrat. Unter der katalytischen Wirkung von LAP freigesetztes p - Nitroanilin kann aufgrund seiner Gelbfärbung kalorimetrisch bestimmt werden. Meßgröße für die im Testansatz vorhandene LAP - Menge ist die Größe der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit.

c) Reaktionsprinzip

$$\text{L-Leucin-Nitranilid} + H_2O \xrightarrow{LAP} \text{p-Nitroanilin} + \text{L-Leucin}$$

9. GLDH

a) Bedeutung im menschlichen Organismus

Zur Diagnose und Verlaufsbeobachtung bei Lebererkrankungen haben sich neben der Verlaufsbestimmung der Enzymaktivitäten von GOT, GPT und LDH auch die der GLDH bewährt. Die GLDH ist in den Leberzellen in den Mitochondrien lokalisiert, außerdem ist der GLDH - Gehalt der Leber sehr viel höher als der anderer Organe. Bei Leberzellnekrose kommt es daher zu einem Anstieg der GLDH - Aktivität im Serum. Der GLDH - Anstieg im Serum ist jedoch verglichen mit dem der cytoplasmatischen GPT und der nur teilweise mitochondrialen GOT auch bei erheblichem Leberschaden nur gering. Bei erzündlichen Lebererkrankungen ist der Anteil der Nekrosen an der allgemeinen Zellschädigung um so größer, je höher die GLDH - Aktivität im Vergleich zur Transaminasen - Aktivität ist, d. h. je kleiner der Quotien $\frac{GOT + GPT}{GLDH}$ ist.

b) Bestimmung

Eine Bestimmung der GLDH - Aktivität wird mit α - Ketoglutarat als Substrat durchgeführt. Die GLDH katalysiert dabei die Reaktion des α - Ketoglutarates mit Ammoniumionen unter Zugabe von NADH. Die Messung erfolgt nach der Zweipunktmethode, da die Umsatzgröße des zu messenden Reaktionspartners gering ist. Meßgröße ist dabei die Abnahme der NADH - Konzentration pro Zeiteinheit.

c) Reaktionsprinzip

$$\alpha\text{ - Ketoglutarat} + NADH + NH_4^+ \xrightarrow{GLDH} \text{L - Glutamat} + NAD^+ + H_2O$$

III. Immunologische Albuminbestimmung des Nasensekrets zur quantitativen Enzymanalyse

Die Gesamtmenge des menschlichen Nasensekrets variiert stark und damit natürlich auch die gesamte enthaltene Enzymmenge. Sie ist unterschiedlich von Patient zu Patient, von Tages- zur Nachtzeit sowie dem jeweiligen Überwiegen des Sympatico- bzw. Parasympaticotonus abhängig. Die immunelektrophoretische Analyse des Sekrets ergab, daß alle Serumsproteine in mehr oder weniger ähnlichen Reaktionen auch im Nasensekret vorhanden sind.

Um nach der Ausführung von Enzymtests eine Aussage machen zu können über die Enzymaktivität im Serum im Gegensatz zu derjenigen im Nasensekret und auch vergleichsweise der Enzymaktivitäten in den verschiedenen Nasensekreten untereinander, müssen alle Ergebnisse auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden. In diesem Fall wurde das im menschlichen Nasensekret enthaltene Albumin gewählt. Alle in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnisse für Enzymaktivitäten im Nasensekret haben daher die Benennung $\frac{mU}{mg}$ Albumin.

Es wird immunologisch eine Mengenbestimmung des Albumins auf Partigenplatten (Behringwerke) nach der Methode von Mancini durchgeführt.

Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion nach Mancini (12):

Das Prinzip besteht darin, daß von einem zylinderförmigen Startloch aus die gelösten Antigenmoleküle radial in eine gleichmäßig dicke Agargelschicht hineindiffundieren. Diese enthält das homogene Anti-

serum, wodurch sich ein Präzipitatzylinder ausbildet. Die kreisförmige Grundfläche des Zylinders ist nach beendeter Diffusion direkt proportional der Menge des Antigens bei vorgegebener Antiserumkonzentration im Reaktionsgel.

Trägt man die Kreisfläche r als Funktion der Antigenmenge a (= Antigenkonzentration · Volumen der Antigenlösung) in einem Koordinatensystem auf, so resultiert eine geradlinige Beziehung, die der Gleichung $r = K \cdot Q + S$ gehorcht. (13)

Der Ordinatenabschnitt S, also der Schnittpunkt der Eichgeraden mit der Ordinate läßt eine Aussage über die Größe der Auftragstelle zu. Die Steigung K ist umgekehrt proportional der Antiserumkonzentration im Gel sowie dessen Schichtdicke.

Der zu messende Radius bzw. Durchmesser des Präzipitatzylinders ist eine Funktion der aufgetragenen Antigenmenge, wenn es gelingt, durch geeignete Standardisierungsmaßnahmen die durch K und S bedingten Variablen konstant zu halten. Es werden bei allen Standard- und Analysenproben genau gleiche Volumina der Antigenlösung in die Startlöcher gefüllt. Mit Hilfe der standardisierten Proteinpräparate erhält man eine Bezugskurve und daraus die Antigenkonzentration einer Analysenlösung. Zur Aufstellund der Eichkurve wird der Durchmesser der Präzipitatringe ausgemessen, welche sich bei einer Standardlösung ergeben haben. Es ergibt sich eine geradlinig verlaufende Bezugskurve, wenn der quadrierte Durchmesser als Funktion der Antigenkonzentration aufgetragen wird. Würde der Durchmesser auf linearem Millimeterpapier in Abhängigkeit von der jeweiligen Proteinkonzentration aufgetragen, so er-

gäbe sich dabei eine nicht lineare Kurve.

Nach Messung der Durchmesser der Präzipitatzylinder, welche sich um die Auftragestellen der zu untersuchenden Sekrete gebildet haben, werden diese quadriert und anschließend auf der Eichkurve die zugehörige Proteinkonzentration abgelesen. (13)

C. Ergebnisse

I. Kurz zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse von Abbildungen I - IX mit Werten der Einzelmessungen

An Hand von Untersuchungen an einer Gruppe von Patienten ohne pathologische Veränderung des Respirationstraktes wurde das Vorkommen von Enzymen des Intermediärstoffwechsels im menschlichen Nasensekret nachgewoesen. Es konnten aufgrund von Reihenuntersuchungen für das Vorkommen der Enzyme LDH, GOT, CPK, α-HBDH, AP, SP, LAP und GLDH Normbereiche aufgestellt werden. An Hand von Übersichtsabbildungen für jedes einzelnes Enzym wird dessen Häufigkeit in allen vorkommenden Konzentrationsbereichen graphisch dargestellt, wobei auf der Abszisse jeweils der Konzentrationsbereich abgelesen werden kann und auf der Ordinate die Anzahl der in diesem Bereich vorkommenden Fälle.

1. LDH (Abb. I)

Die LDH, an 95 Patienten getestet, zeigt Aktivitätswerte im Nasensekret, die in einem weiten Bereich bis zu 1000 mU/mg Albumin liegen, wobei jedoch ein Viertel der Untersuchungsergebnisse zwischen 200 und 300 mU/mg Albumin liegen. Die folgenden Zahlen geben die Enzymaktivitäten im Nasensekret in mU/mg Albumin an.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der LDH:

230; 996; 870; 163; 100; 204; 384; 771; 700; 444; 707; 900; 907; 182; 448; 357; 401; 477; 275; 286; 202; 843; 900; 237; 400; 156; 168; 285; 573; 64; 71; 232; 201; 98; 400; 300; 180; 299; 146; 382; 222; 207; 182; 238; 263; 366; 344; 432; 666; 895; 348; 296; 405; 242; 444; 264; 167; 57; 350; 462; 296; 819; 261; 360; 885; 596; 987; 832; 710; 297; 728; 380; 540; 933; 388; 167; 157; 765; 932; 351; 477; 254; 431; 152; 243; 819; 254; 141; 146; 447; 497; 277; 819; 165; [mU/mg Albumin]

n = 95; Mittelwert x = 413

2. GOT (Abb. II)

Die physiologischen Werte der GOT (n = 86) liegen im Nasensekret zwischen Grenzwerten bei 0 und 70 mU/mg Albumin, ohne ein deutlich zu erkennendes Häufigkeitsmaximum.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der GOT:

11; 57; 14; 54; 8; 17; 43; 21; 41; 68; 32; 50; 42; 18; 14; 33; 6; 18; 17; 15; 18; 38; 10; 16; 21; 44; 33; 17; 37; 15; 10; 16; 20; 42; 53; 15; 9; 11; 4; 12; 38; 25; 38; 29; 32; 2; 31; 45; 43; 25; 11; 28; 10; 8; 37; 52; 33; 15; 14; 70; 42; 55; 24; 70; 41; 55; 61; 70; 22; 51; 41; 22; 25; 56; 52; 16; 64; 23; 53; 15; 9; 19; 24; 16; 48; 11; [mU/mg Albumin]

n = 86; Mittelwert x = 30,2

3. GPT (Abb. III)

Die GPT (n = 103) zeigt in bezug auf das Vorkommen im Nasensekret eine relstiv enge Verteilung. Die stärkste Häufung der Meßergebnisse finden wir bei den untersuchten Fällen im Bereich von 0 - 10 mU/mg Albumin. Es konnten jedoch maximale Werte bis zu 30 mU/mg Albumin festgestellt werden.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der GPT:

3; 25; 17; 4; 7; 3; 10; 9; 8; 9; 7; 7; 9; 12; 7; 10; 5; 15; 2; 4; 1; 5; 11; 10; 12; 10; 7; 2; 3; 2; 11; 2; 1; 3; 4; 3; 13; 12; 5; 5; 2; 4; 6; 7; 6; 16; 5; 13; 5; 10; 1; 3; 18; 8; 17; 26; 22; 3; 4; 7; 5; 4; 26; 14; 25; 19; 12; 17; 22; 11; 9; 13; 21; 13; 15; 24; 20; 13; 22; 22; 10; 14; 9; 40; 23; 3; 7; 22; [mU/mg Albumin]

n = 103; Mittelwert x = 10,69

4. CPK

Bei der CPK (n = 74) liegt das Aktivitätsmuster der untersuchten Fälle in einem weiten Normbereich bis zu 70 mU/mg Albumin. Die größte Häufung der Meßergebnisse zeigt der Bereich zwischen 0 und 10 mU/mg Albumin. Mit einer Zunahme der Aktivität pro mg Albumin nimmt die Häufigkeit des Vorkommens konstant ab.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der CPK:

7; 35; 17; 57; 23; 33; 26; 13; 8; 20; 18; 16; 7; 10; 13; 30; 47; 29; 33; 1; 1; 20; 1; 25; 20; 15; 6; 9; 15; 5; 5; 12; 8; 12; 1; 49; 19; 34; 8; 8;

13; 10; 7; 16; 10; 13; 10; 27; 64; 11; 0; 20; 21; 24; 30; 10; 25; 53; 28; 13; 24; 35; 30; 8; 40; 0; 21; 0; 43; 0,2; 1; 8; [mU/mg Albumin]

n = 74; Mittelwert x = 18,6

5. α - HBDH (Abb. V)

Die Messungen der α - HBDH (n = 79) lassen auf einen weiten Normbereich schließen, mit Werten, die zwischen 0 und 800 mU/mg Albumin liegen. Im Konzentrationsbereich zwischen 100 und 200 mU/mg Albumin liegt die größte Anzahl der Meßergebnisse.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der α - HBDH:

129; 725; 368; 72; 415; 104; 600; 375; 218; 337; 420; 456; 427; 172; 457; 75; 130; 127; 107; 242; 347; 140; 170; 186; 453; 457; 225; 403; 115; 130; 166; 158; 32; 38; 118; 140; 72; 323; 381; 149; 270; 157; 291; 134; 210; 163; 156; 197; 161; 145; 178; 156; 283; 351; 385; 248; 261; 315; 196; 310; 287; 145; 97; 386; 400; 362; 785; 324; 460; 232; 356; 557; 322; 576; 593; 203; 375; 290; 275; [mU/mg Albumin]

n = 79; Mittelwert x = 275,2

6. Alkalische Phosphatase (Abb. VI)

Die Enzymaktivitäten der AP (n = 87) liegen unter physiologischen Bedingungen in einem Bereich bis zu 55 mU/mg Albumin mit einem Häufigkeitsmaximum zwischen 5 und 10 mU/mg Albumin.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der AP:

46; 13; 15; 52; 16; 18; 20; 52; 15; 17; 11; 15; 8; 8; 5; 9; 8; 3; 13; 16; 4; 5; 4; 17; 22; 10; 6; 4; 8; 8; 10; 2; 3; 20; 10; 6; 20; 14; 9; 15; 11; 9; 6; 10; 12; 4; 8; 5; 12; 5; 7; 16; 8; 12; 4; 12; 12; 5; 6; 7; 7; 11; 9; 23; 31; 34; 33; 34; 24; 33; 4; 30; 9; 30; 23; 28; 15; 18; 28; 37; 20; 28; 7; 3; 8; 10; 24; [mU/mg Albumin]

n = 87; Mittelwert x = 15,16

7. Saure Phosphatase (Abb. VII)

Als Normbereich der SP (n = 76) konnte ein Bereich mit Grenzwerten bei 1 und 37 mU/mg Albumin ermittelt werden. Ein deutlich erkennbares Häufigkeitsmaximum liegt zwischen 5 und 10 mU/mg Albumin. Das Vorkommen nimmt gleichzeitig mit zunehmenden Aktivitätswerten ab.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der SA:

7,1; 3,7; 4,8; 3,4; 4,2; 9,8; 6,5; 5,9; 2,4; 6,6; 6,0; 13,0; 8,8; 2,3; 8,0; 6,1; 7,4; 6,4; 8,0; 2,0; 5,5; 2,0; 6,5; 7,6; 9,0; 11,5; 5,3; 6,2; 6,4; 9,0; 1,3; 1,8; 2,6; 10,6; 2,2; 13,6; 15,3; 6,6; 16,3; 9,8; 8,3; 12,5; 6,5; 4,8; 5,9; 9,2; 5,9; 10,5; 10,6; 23,9; 8,0; 18,1; 25,1; 15,0; 3,4; 16,2; 18,1; 37,1; 13,0; 13,7; 27,0; 4,3; 23,3; 21,1; 16,2; 5,3; 19,2; 6,6; 27,7; 24,1; 14,0; 10,8; 23,5; 23,0; 7,0; 5,0; [mU/mg Albumin]

n = 76; Mittelwert x = 10,48

8. LAP (Abb. VIII)

Als Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung der LAP (n = 83) ließen sich Werte in einem Bereich bis zu 20 mU/mg Albumin ermitteln. Eine starke Häufung der Meßergebnisse ist in einem Bereich bis zu 5 mU/mg Albumin zu erkennen. Die Zahl der Messungen in Bereichen mit zunehmender Enzymaktivität nimmt sehr schnell ab.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der LAP:

0,9; 9; 4; 15,7; 5; 2,5; 4,2; 10; 12; 3; 5; 3; 6; 6; 4; 1; 3; 2; 7; 4; 4; 1; 2,5; 4; 10; 20; 3; 3; 2; 2; 2; 6; 1; 1; 5; 2; 3; 12; 4; 2; 3; 2; 2; 3; 4; 2; 4; 2; 3; 1; 3; 1; 10; 0; 0; 4; 3; 5; 0; 2; 2; 9; 4; 8; 5; 4; 13; 12; 7; 4; 0; 7; 6; 7; 3; 4; 3; 2; 4; 14; 5; 3; [mU/mg Albumin]

n = 83; Mittelwert x = 4,896

9. GLDH (Abb. IX)

Die Enzymaktivität der GLDH (n = 71) war meßbar in einem Bereich bis zu 6,5 mU/mg Albumin unter physiologischen Bedingungen. Die Meßzahl der Meßergebnisse liegt in dem Bereich zwischen 0 und 2,5 mU/mg Albumin.

Werte der Einzelmessungen der quantitativen Bestimmung der GLDH:

2,2; 1,8; 2,2; 5,5; 2,2; 1,0; 1,7; 2,4; 1,3; 0,6; 0,9; 0,4; 2,0; 2,6; 0,3; 1,5; 0,4; 2,5; 3,0; 1,5; 0,7; 0,8; 1,6; 0,6; 0,7; 0,9; 0,4; 0,9; 1,5; 5,1;

2,0; 3,4; 1,8; 0,6; 1,7; 2,9; 1,4; 2,5; 2,6; 1,7; 4,2; 0,4; 5,0; 0,8; 2,1; 1,5; 3,7; 1,6; 1,7; 2,5; 3,5; 2,9; 0,5; 4,3; 2,1; 1,4; 6,1; 2,0; 5,9; 0,7; 5,3; 4,2; 5,8; 0,4; 0,3; 4,4; 6,3; 0,5; 2,2; 4,1; 4,8; [mU/mg Albumin]

n = 71; Mittelwert x = 2,43

II. Kurz zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Abbildungen X - XIII mit Werten der Einzelmessungen

Bei Untersuchungen an Patienten mit bestimmten internen Erkrankungen, bei denen man extrem hohe Spiegel von Enzymen des Intermediärstoffwechsels im Serum findet, konnte eine simultane Konzentrationserhöhung der wirkungsgleichen Enzyme im Nasensekret nicht festgestellt werden. Es wurden bei dieser Ermittlung die Enzymaktivitätswerte im Nasensekret bei Krankheitsbildern wie akute Hepatitis (GOT und GPT), Verschlußikterus (LAP) bei Cholelithiasis, Prostatacarcinom (SP) und nach Herzinfarkt (LDH und CPK) im Vergleich mit den entsprechenden Serumenzymaktivitäten festgestellt. Die Abbildungen X - XIII zeigen die jeweiligen Ergebnisse, für jedes Krankheitsbild getrennt, wobei für jeden Patienten auf der Abszisse links der im Serum vorhandene Wert und rechts daneben die im Nasensekret ermittelte Enzymaktivität gegenübergestellt ist. Die Meßergebnisse, die im Serum die Benennung mU/ml und im Nasensekret mU/mg Albumin bestzen, können an der Ordinate abgelesen werden.

Abb. X

Abb. X zeigt, daß bei 5 Fällen von akuter Hepatitis mit verschieden hohem Anstieg der GOT und GPT im Serum sich in keinem Fall eine Erhöhung dieser Enzymaktivitäten im Nasensekret feststellen läßt. Es war eine solche selbst bei extrem erhöhten Serumwerten der GOT und GPT von über 1000 mU nicht nachweisbar.

Werte der Einzelmessungen der GOT und GPT in Serum und Nasensekret bei Hepatitis (Abb. X):

Patient 1:	GOT	S:	1020	Ns:	50
	GPT	S:	1050	Ns:	20
Patient 2:	GOT	S:	382	Ns:	42
	GPT	S:	350	Ns:	74
Patient 3:	GOT	S:	386	Ns:	64
	GPT	S:	640	Ns:	18
Patient 4:	GOT	S:	320	Ns:	42
	GPT	S:	430	Ns:	24
Patient 5:	GOT	S:	156	Ns:	26
	GPT	S:	428	Ns:	22

Abb. XI

Abb. XI zeigt 6 Fälle von Verschlußikterus bei Cholelithiasis mit hohen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase im Serum. In der Vergleichsuntersuchung ließ sich im Nasensekret kein Anstieg des wirkungsgleichen Enzyms über den Normbereich hinaus feststellen.

Werte der Einzelmessungen der alkalischen Phosphatase bei Verschlußikterus in Nasensekret und Serum (Abb. XI):

Patient 1:	S:	340	Ns:	8,0

Patient 2:	S:	328,0	Ns:	4,0
Patient 3:	S:	290,0	Ns:	3,2
Patient 4:	S:	276,3	Ns:	19,0
Patient 5:	S:	182,5	Ns:	17,7
Patient 6:	S:	140,8	Ns:	17,4

Abb. XII

Abb. XII zeigt die Ergebnisse von 5 Fällen von Prostatacarcinom. Die Erkrankung ist durch hohe Aktivitäten der sauren Phosphatase im Serum gekennzeichnet. Die graphische Gegenüberstellung der Enzymaktivitäten in Serum und Nasensekret zeigt wiederum, daß trotz stark erhöhten Serumwerten die Aktivitäten im Nasensekret wiederum im Bereich der Norm liegen.

Werte der Einzelmessungen der sauren Phosphatase bei Prostatacarcinom in Nasensekret und Serum (Abb. XII):

Patient 1:	S:	48,4	Ns:	4,3
Patient 2:	S:	33,2	Ns:	9,1
Patient 3:	S:	28,1	Ns:	6,2
Patient 4:	S:	19,2	Ns:	4,4
Patient 5:	S:	18,1	Ns:	7,3

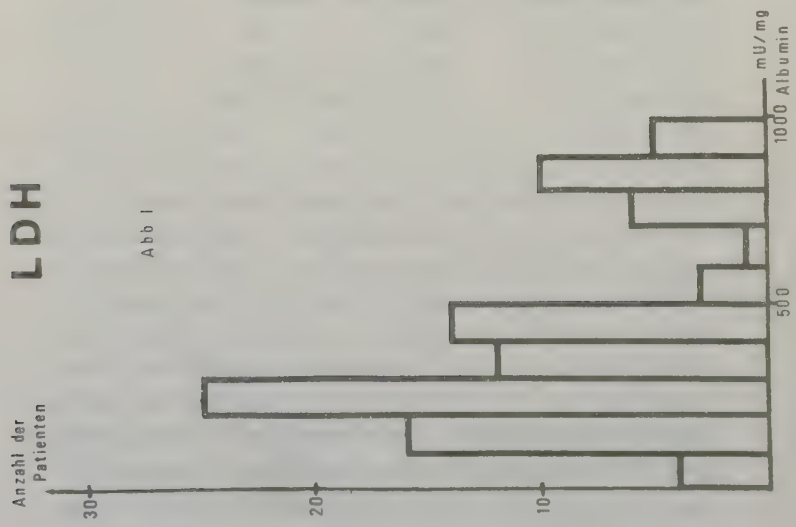
Abb. XIII

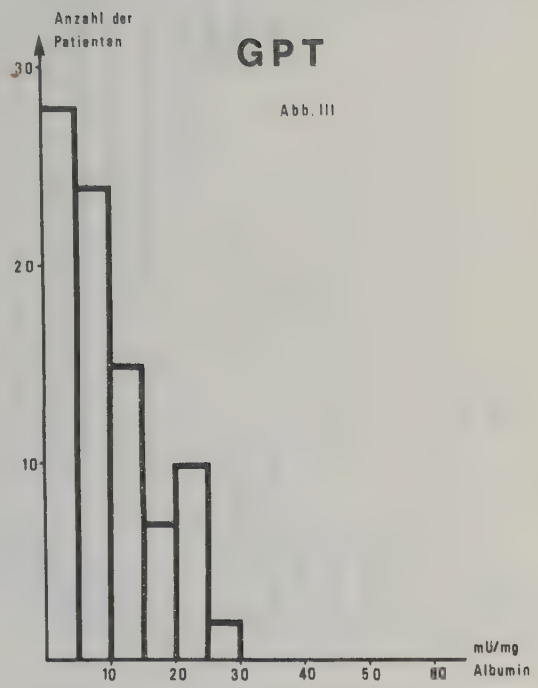
Abb. XIII zeigt in 4 Fällen die Ergebnisse einer Untersuchung von Serum und Nasensekret bei Patienten mit Herzinfarkt, bei denen sich erhöhte Werte der CPK und LDH im Serum feststellen lassen. Die Werte der entsprechenden Enzymaktivitäten im Nasensekret liegen auch dieses Mal im Normbereich.

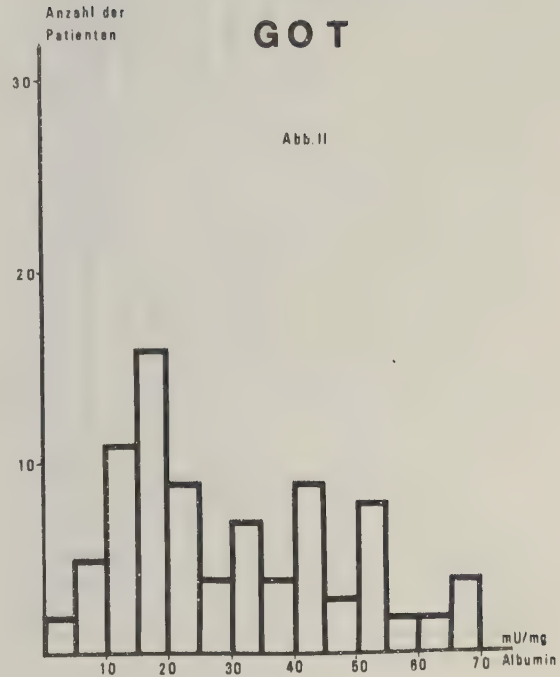
Werte der Einzelmessungen der CPK und LDH bei Herzinfarkt in Nasensekret und Serum (Abb. XIII):

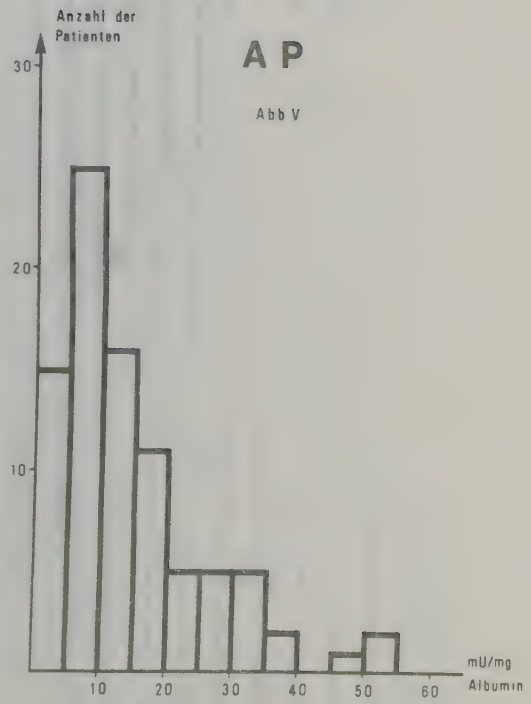
Patient 1:	CPK	S:	420	Ns:	18
	LDH	S:	1205	Ns:	100
Patient 2:	CPK	S:	315	Ns:	28
	LDH	S:	886	Ns:	205
Patiet 3:	CPK	S:	142	Ns:	26
	LDH	S:	705	Ns:	295
Patient 4:	CPK	S:	78	Ns:	27
	LDH	S:	420	Ns:	170

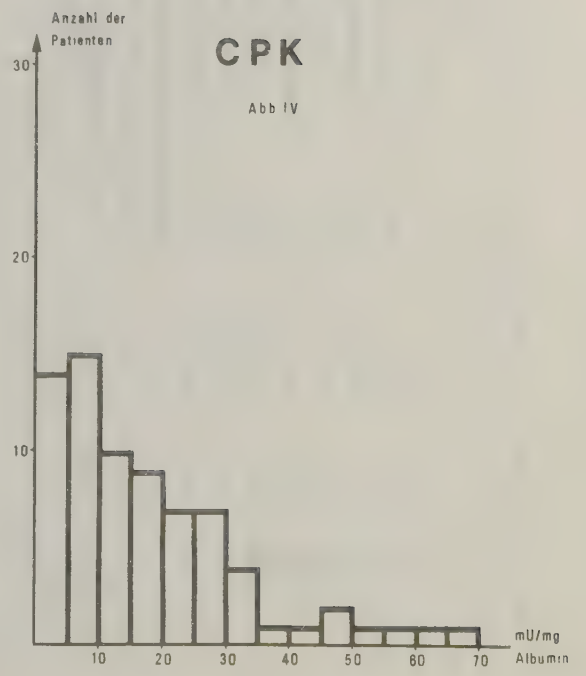
III. Graphische Darstellungen der Meßergebnisse in Abb. I - XIII

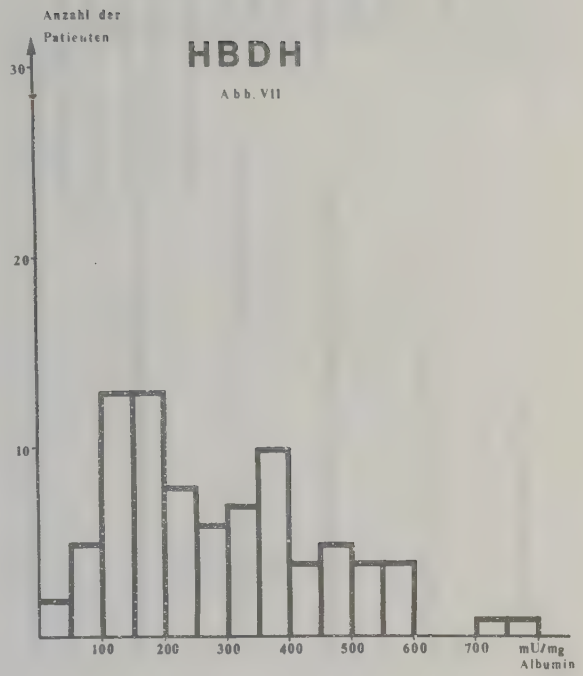


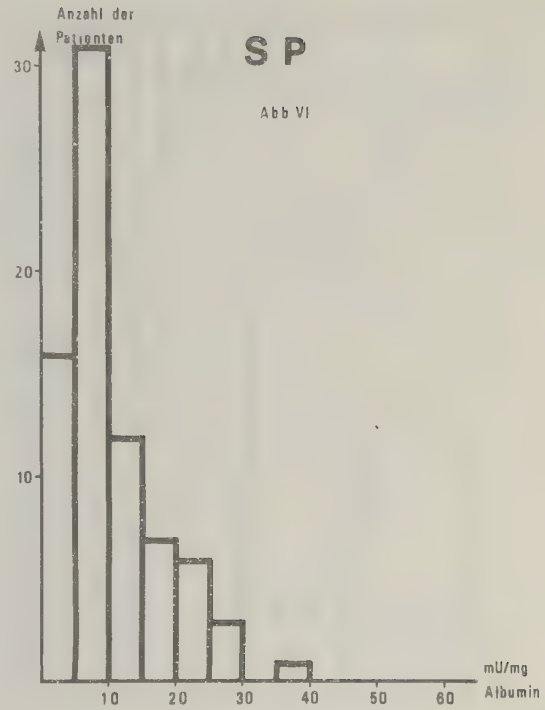

Anzahl der Patienten
GPT
Abb. III
30
20
10
10
20
30
40
50
60
mU/mg Albumin

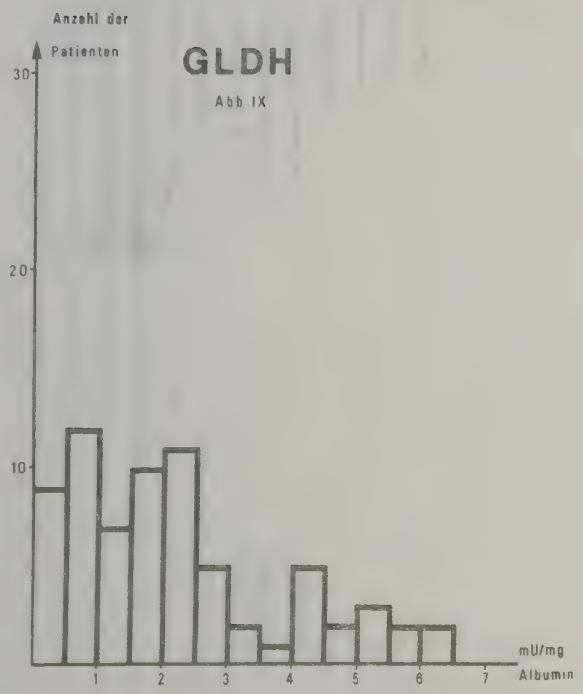

Anzahl der Patienten
GOT
Abb. II
30
20
10
10
20
30
40
50
60
70
mU/mg Albumin

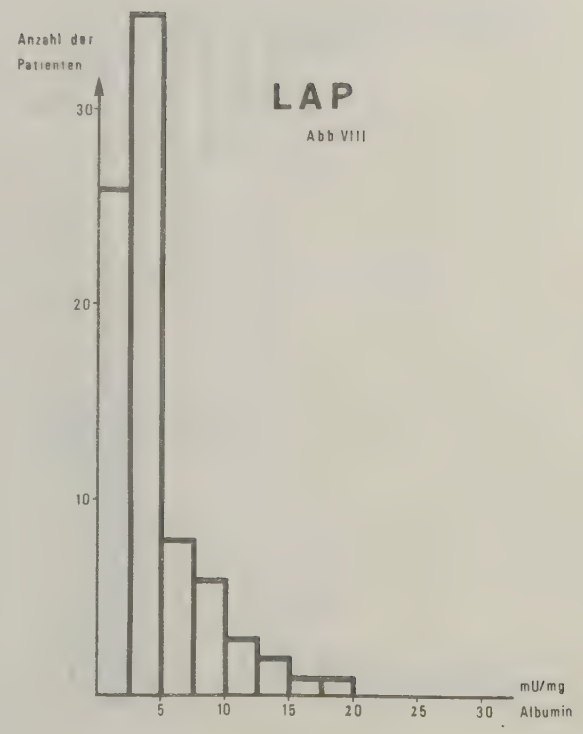

Anzahl der Patienten
AP
Abb V
30
20
10
10
20
30
40
50
60
mU/mg Albumin

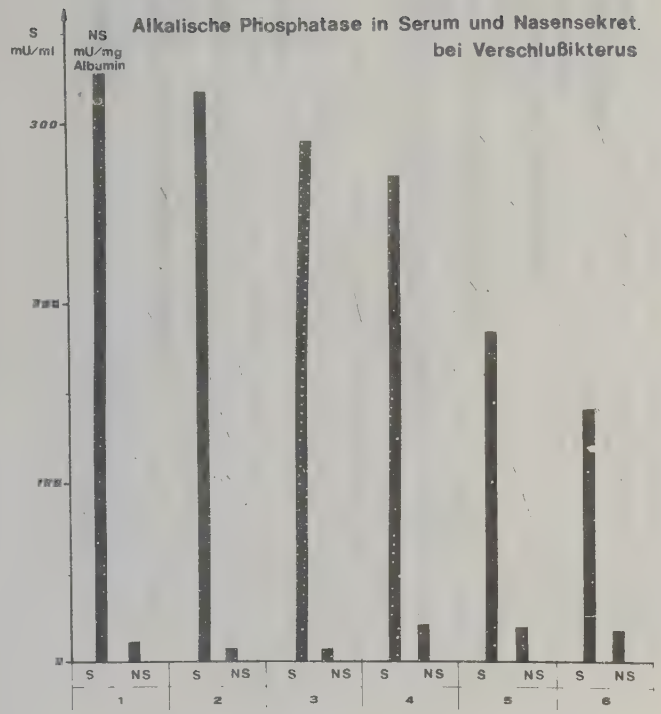

Anzahl der Patienten
CPK
Abb IV
30
20
10
10
20
30
40
50
60
70
mU/mg Albumin

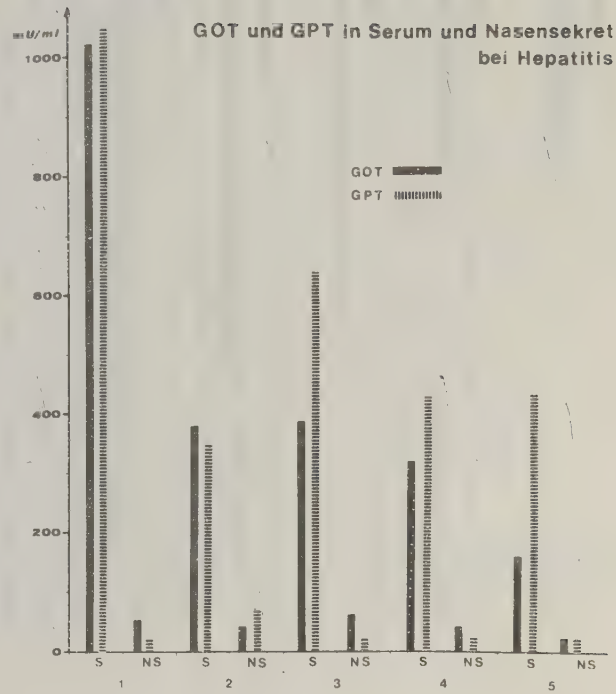

HBDH
Abb. VII
Anzahl der Patienten
30
20
10
100
200
300
400
500
600
700
mU/mg Albumin

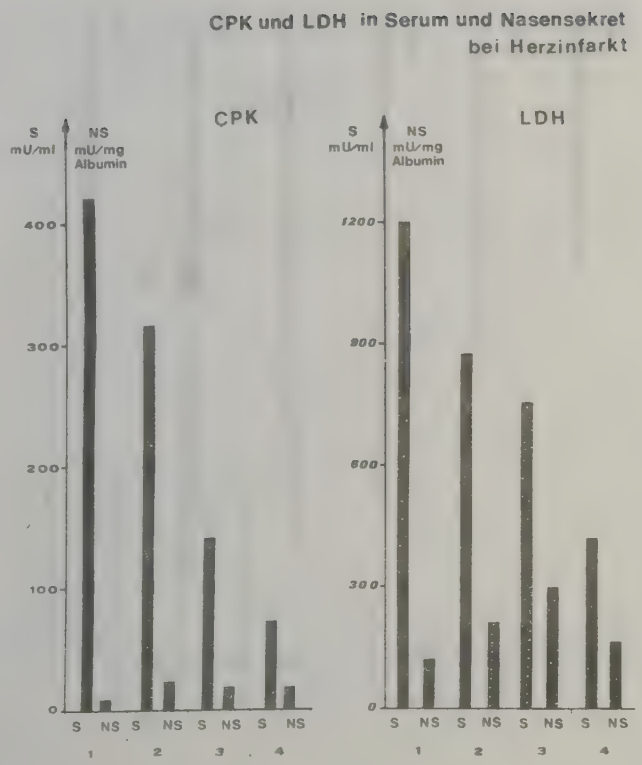

SP
Abb VI
Anzahl der Patienten
30
20
10
10
20
30
40
50
60
mU/mg Albumin

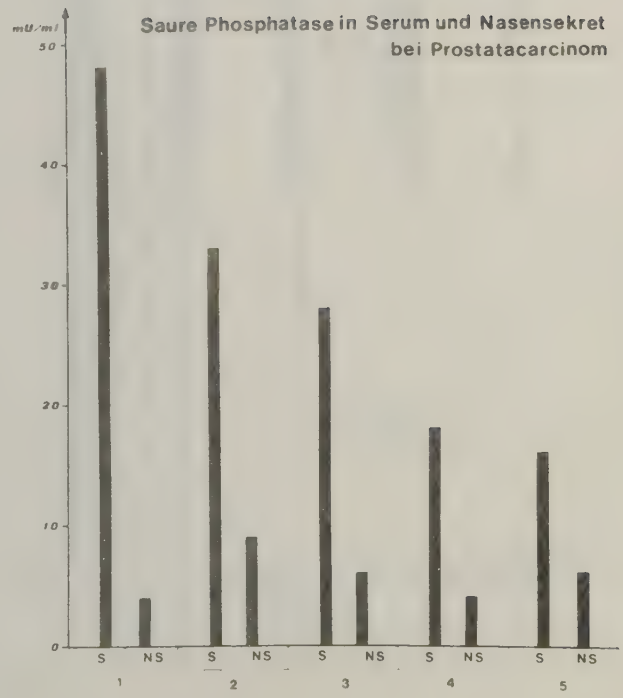

Anzahl der
Patienten
GLDH
Abb IX
30
20
10
1
2
3
4
5
6
7
mU/mg
Albumin


Anzahl der
Patienten
LAP
Abb VIII
30
20
10
5
10
15
20
25
30
mU/mg
Albumin


Alkalische Phosphatase in Serum und Nasensekret
bei Verschlußikterus
S
mU/ml
NS
mU/mg
Albumin
300
S NS S NS S NS S NS S NS S NS
1 2 3 4 5 6


GOT und GPT in Serum und Nasensekret
bei Hepatitis
mU/ml
1000
800
600
400
200
0
GOT
GPT
S NS S NS S NS S NS S NS
1 2 3 4 5


CPK und LDH in Serum und Nasensekret
bei Herzinfarkt
CPK
S mU/ml
NS mU/mg Albumin
400
300
200
100
0
S NS S NS S NS S NS
1 2 3 4
LDH
S mU/ml
NS mU/mg Albumin
1200
900
600
300
0
S NS S NS S NS S NS
1 2 3 4


Saure Phosphatase in Serum und Nasensekret
bei Prostatacarcinom
mU/ml
50
40
30
20
10
0
S NS S NS S NS S NS S NS
1 2 3 4 5

D. Diskussion

Die Theorien und Ergebnisse einiger weniger Untersuchungen über die Transsudationstätigkeit der menschlichen Nasenschleimhaut unter physiologischen Bedingungen weichen in ihren Ergebnissen und ihrer Methodik stark voneinander ab.

Nach intravenöser Applikation von Fluorescin konnte dieser Stoff unter physiologischen Bedingungen im Nasensekret nicht nachgewiesen werden, ist jedoch bei bestimmten pathologischen Veränderungen an der Schleimhaut auf eine gewisse Transsudation aus dem Intravasalraum oder dem Interstitium geschlossen werden. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen kommt es ebenfalls zu einer Transsudation von humoralen Proteaseninhibitoren in das Sekret. Da jedoch weder ein genaues Ausmaß der Transsudationsrate von Enzymen durch die Schleimhaut unter physiologischen, noch unter pathologischen Bedingungen, bekannt ist, soll dieses an Hand moderner analytischer Methoden bestimmt werden.

Die klinische Enzymologie hat in den letzten Jahren einen raschen Aufschwung genommen. Sie wird heute nicht mehr allein zur Diagnostik innerer Erkrankungen angewendet, sondern seit Wroblewsky wird in vielen Arbeitsgruppen auch die Messung von Enzymaktivitäten in Punktionsflüssigkeiten versucht. Es trat die Frage auf, ob nicht auch Enzyme des Intermediärstoffwechsels im menschlichen Nasensekret nachweisbar wären. Wir könnten an Hand eines größeren Probandenkollektivs ohne pathologische Veränderungen im Bereich des oberen Respirationstraktes das Vorhandensein definierter Enzyme des Intermediärstoff-

wechsels im Nasensekret nachweisen. Es wurden die Enzymaktivitäten LDH, GOT, GPT, CPK, HBDH, saure und alkalische Phosphatase, LAP und GLDH im Nasensekret überprüft zusammen mit einer gleichzeitigen vergleichenden Bestimmung derselben Enzyme im Serum. Aufgrund unserer Meßergebnisse können wir folgende Aussage machen:

Alle Enzyme sind im menschlichen Nasensekret in bestimmten Mengen nachweisbar. Es lassen sich für die einzelnen Enzyme, bezogen auf 1 mg Albumin, folgende Normbereiche aufstellen:

LDH	:	0 - 1000 mU/mg Albumin
GOT	:	5 - 70 mU/mg Albumin
GPT	:	0 - 30 mU/mg Albumin
LPK	:	0 - 70 mU/mg Albumin
alk. Phosphatase	:	0 - 55 mU/mg Albumin
saure Phosphatase	:	0 - 40 mU/mg Akbumin
HBDH	:	0 - 800 mU/mg Albumin
LAP	:	0 - 20 mU/mg Albumin
GLDH	:	0 - 6,5 mU/mg Albumin

Die Streuung der Meßergebnisse bei den einzelnen Enzymen im Nasensekret ist sehr groß, so daß sich im Gegensatz zum Serum sehr weite Normbereiche ergeben. Diese Tatsache kann dazu führen, daß diese Ergebnisse für spätere diagnostische Untersuchungen nicht brauchbar sind, wenn die pathologischen Werte nicht stark davon abweichen.

Da bestimmt innere Erkrankungen des Organismus mit starken Erhöhungen einzelner Enzymaktivitäten im Serum einhergehen, ließe dies den Schluß zu, daß bei einer starken Transsudationstätigkeit der Schleimhaut sich eine simultane Konzentrationserhöhung der

entsprechenden Enzyme im Nasensekret ergeben müßte.

Die graphischen Gegenüberstellungen in Abb. X, XI, XII und XIII von Serum und Nasensekret zeigen, daß bei allen Patienten, trotz stark erhöhten Serumwerten, ein Anstieg der Aktivität im Nasensekret über den Normbereich hinaus nicht zu verzeichnen ist. Besonders deutlich wird dies bei denjenigen Fällen, bei denen sich Extremwerte im Serum nachweisen lassen, die ein Vielfaches der Norm überschreiten.

Die akute Hepatitis ist gekennzeichnet durch ein starkes Ansteigen der GOT und GPT im Serum, wobei die nekrotisierende Verlaufsform der Virushepatitis oft besonders hohe Transaminasenaktivitäten zeigt. Der Quotient der $\frac{GOT}{GPT}$ ist dabei höher als bei der unkomplizierten Form.

Es ließen sich bei unseren Untersuchungen selbst bei einer akuten Hepatitis mit Serumwerten von über 1000 mU/ml für GOT und GPT bei einem Normbereich bis zu 20 mU/ml keine erhöhten Aktivitäten der Transaminasen im Nasensekret außerhalb des vorher ermittelten Normbereiches feststellen.

Besonders deutlich wird dies auch bei einem Fall nach Herzinfarkt mit 400 mU/ml CPK und über 1200 mU/ml LDH im Serum. Trotz 10facher Erhöhung der Serumwerte (Normbereich für CPK bis 50 mU/ml; Normbereich für LDH von 120 - 240 mU/ml) liegt der Aktivitätswert im Sekret wiederum im ermittelten Normbereich. Bei einem Prostatacarcinom mit 48 mU/ml saurer Phosphatase im Serum bei einer Norm bis zu 4 mU/ml ließ sich ebenso keine erhöhte Aktivität im Nasensekret nachweisen.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die im Nasensekret vorhandenen Enzyme, unabhängig von der Aktivitätshöhe der Enzyme im Serum, in einem bestimmten Normbereich vorkommen. Sie können daher nicht durch Transsudation durch die Schleimhaut vom Serum in das Sekret gelangen, sondern müssen ein Produkt der Schleimhäute selbst sein. Daraus kann die Folgerung gezogen werden, daß durch die Bestimmung der obengenannten Enzymaktivitäten im Nasensekret eine enzymchemische Diagnostik der Schleimhautfunktion und des Schleimhautzustandes möglich ist.

E. Experimenteller Teil

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nasensekrete stammen von Patienten ohne pathologische Veränderungen im Bereich der Nase, der Nasennebenhöhlen und der oberen Luftwege.

I. Sekretentnahme

Die Sekretentnahme erfolgte durch Einlegen von zwei, mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Baumwolltampons in die unteren Nasengänge. Nach etwa 30 Minuten wurden die Tampons ertfernt und das aufgesogene Sekret in Zentrifugengläser mit 2 ml 0,05 M Boratpuffer pH 8,0 ausgewaschen. Das Eluat wurde abzentrifugiert und der Überstand für die Messungen verwendet.

II. Blutentnahme

Jedem Patienten wurden zusätzlich ca. 10 cm^3 Blut entnommen. Nach eingetretener Gerinnung wurde es 10 Minuten zentrifugiert und das Serum danach abgetrennt.

III. Bestimmung der Enzymaltivitäten in Nasensekret und Serum

Die Enzymaktivitäten im Serum bzw. im Sekret wird in internationalen Enzymeinheiten pro ml angegeben. 1 Enzymaktivität = 1 U ist diejenige Enzymaktivität, die bei 25° C den Umsatz von 1 Mikromol Substanz in 1 Minute bewirkt. Mit Volumenaktivität ist die Enzymaktivität pro Volumeneinheit gemeint.

Zum Nachweis der gemessenen Enzyme wurden Testkombinationen der Fa. Boehringer verwendet.

1. LDH (14, 15, 16)

a) Material:

Lösung 1: 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
0,60 mM Pyruvat
Lösung 2: 0,18 mM NADH

b) Methode:

3 ml Lösung 1, 0,05 ml Lösung 2 und 0,10 ml Sekret bzw. Serum werden in eine Küvette pipettiert, gemischt und die Extinktion jeweils nach genau 1,2 und 3 Min. am Photometer (Hg 366 nm; 25° C) abgelesen. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wird der Mittelwert gebildet und dieser in die Berechnung eingesetzt.

Volumenaktivität = 9545 $\cdot \Delta E$ / min (mU/ml)

2. GOT (17, 18)

a) Material:

80 mM Phosphatpuffer pH 7,4
12 mM α - Ketoglutarat
200 mM L - Aspartat
0,18 mM NADH
600 U MDH pro Liter Testansatz

b) Methode:

Der Inhalt eines GOT - Monotest - Fläschchens

wird mit 3 ml aqua bidest. gelöst, nach 2 Min. weden 0,5 ml Sekret bzw. 0,5 ml Serum zugegeben und gemischt. Die Extinktion wird in einer 1 cm - Küvette am Photometer bei 366 nm und 25° C jeweils nach 1,2 und 3 Minuten abgelesen. In die Berechnung 2121 $\cdot \Delta E$ / Min = mU/ml wird der Mittelwert der Extinktionsdifferenz eingesetzt.

3. GPT (19)

a) Material:

80 mM Phosphatpuffer pH 7,4
18 mM α - Ketoglutarat
800 mM L - Alanin
0,18 mM LDH/Liter Testansatz

b) Methode:

Sie entspricht derjenigen von GOT.

4. CPK (20, 21, 22)

a) Material:

Lösung 1: 0,11 M Triäthanolaminpuffer pH 7,6
22 mM Glukose
11 mM Mg - Acetat
1,1 mM ADP
0,65 mM NADP
38 mM Kratinphosphat
Lösung 2: 0,25 M Gluhathion
Suspension: 1 mg Hexokinase / ml
1 mg G - 6 DH / ml

b) Methode:

2,5 ml Lösung 1, 0,1 ml Lösung 2, 0,02 ml der Suspension und 0,1 ml Sekret bzw. Serum werden gemischt und 5 Minuten in einer Küvette bei 25° C stehengelassen. Danach wird die Anfangsextinktion bei Hg 366 nm abgelesen. Erneute Messung nach 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten. Der Mittelwert aus den Extinktionsdifferenzen wird in die Berechnung $8242 \cdot \frac{\Delta E}{min}$ = Volumenaktivität eingesetzt.

5. α - HBDH (23, 24)

a) Material:

Lösung 1: 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5
3 mM Ketobutyrat
Lösung 2: 0,18 mM NADH

b) Methode:

3 ml Lösung 1, 0,1 ml Lösung 2 und 0,1 ml Serum werden in eine Küvette pipettiert, gemischt und die Extinktion jeweils nach genau 1, 2 und 3 Minuten am Photometer (Hg 366 nm; 25° C) abgelesen. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wird der Mittelwert gebildet und dieser in die Berechnung eingesetzt.

Volumenaktivität = $9697 \cdot \Delta E$ / min (mU/ml)

6. alkalische Phosphatase (25, 26, 27)

a) Material:

Lösung: 50 mM Glycinpuffer pH 10,5
0,5 $MgCl_2$
5,5 mM Natrium - p - nitro - Phenylphosphat

b) Methode:

2 ml der Lösung werden in eine Küvette pipettiert, mit 0,05 ml Sekret bzw. Serum gemischt und 1 Minute bei 25° C im Thermostaten inkubiert. Ablesung der Anfangsextinktion bei 405 nm und 25° C und Wiederholung der Messung nach 1, 2 und 3 Minuten. Aus dem Mittelwert der Extinktionsdifferenzen pro Minute errechnet sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Volumenaktivität = 2216 • Δ E / min

7. Saure Phosphatase (28, 29, 30)

a) Material:

Lösung: 50 mM Citratpuffer pH 8,4
5,5 mM Natrium - p - nitro - Phenylphosphat

b) Methode:

Der Test erfolgt nicht wie bei den übrigen Aktivitätsbestimmungen durch Messung der Probe gegen Luft, sondern gegen einen Leerwert. Dafür werden jeweils in den Leerwertansatz und Probenansatz 1 ml der Lösung pipettiert, in den Probeansatz zusätzlich 0,2 ml Sekret bzw. Serum. Die Reagenzgläser werden 30 Min. bei 37° C im Wasserbad inkubiert, danach wird

die Reaktion durch Zugabe von 10 ml 0,02 u Natronlauge gestoppt. In den Leerwertansatz werden zusätzlich 0,2 ml Sekret bzw. Serum pipettiert. Die Extinktionsmessung der Probe gegen den Leerwert erfolgt bei 405 nm. Die Volumenaktivität berechnet sich aus dem Differenzwert ΔE nach der Gleichung:

Volumenaktivität = 101 $\cdot \Delta E$ (mU/ml)

8. LAP (31, 32)

a) Material:

Lösung 1: 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2
Lösung 2: 0,8 mM Leucin - p - nitranilid

b) Methode:

In einer Küvette werden 3 ml Lösung 1, 0,1 ml Lösung 2 und 0,2 ml Sekret bzw. Serum pipettiert, gemischt und anschließend wird die Extinktion gemessen. Ablesen der Extinktion nach jeweils 1, 2 und 3 Minuten bei Hg 405 nm. Aus den Extinktionsdifferenzen wied der Mittelwert berechnet und in die Gleichung eingesetzt:

Volumenaktivität = 1666 $\cdot \Delta E$ (mU/ml)

9. GLDH (33, 34)

a) Material:

Lösung 1: 50 mM Triäthanolaminpuffer pH 8,0
4 mM Äthylendiamintetraacetat
Lösung 2: 3,2 M Ammoniumacetat

Lösung 3: 12 mM NADH
Lösung 4: 0,41 M α- Ketoglutarat

b) Methode:

In ein Reagenzglas werden 2 ml Lösung 1, 1ml Serum bzw. Sekret, 0,1 ml Lösung 2 und 0,05 ml Lösung 3 pipettiert, gemischt und 20 Minuten bei 25° C im Wasserbad inkubiert. Danach in einer Küvette d = 1 cm bei Wellenlänge Hg 366 nm Extinktion E_1 messen, 10 Minuten nach der 1. Ablesung Extinktion E_2 bestimmen. Nach Zugabe von 0,05 ml Lösung 4 wird die Extinktion E_3 bestimmt und wiederum nach 10 Minuten die Extinktion E_4. Extinktionsdifferenz $E_1 - E_2$ von Extinktionsdifferenz $E_3 - E_4$ abziehen (ΔE) und Berechnung der Aktivität nach der Gleichung:

Aktivität = 97,0 • ΔE (mU/ml)

IV. Auftragen des Sekreteluats auf M - Partigen - Albumin - Immundiffusionsplatten

Es werden pro Patient jeweils 14 μl bzw. 10 μl von dem in 2,5 ml Boratpuffer pH 8,0 aufgeschwemmten Nasensekret, das zur Säuberung von nicht löslichen Bestandteilen abzentrifugiert wurde, in einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufgezogen und jeweils in die Mitte der in den Partigenplatten ausgestanzten Startlöchern aufgetragen. Diese 2 Werte pro Patient ergeben eine gute Kontrolle der Meßergebnisse und der Auftraggenauigkeit, da aus dem Radius des Präzipitatringes für 10 μl derjenige für 14 μl erst

errechnet und danach mit dem gemessenen Wert verglichen werden kann. Die Partigenplatte muß bei der Sekretauftragung völlig eben liegen. Eine Auswertung der Ergebnisse ist frühestens nach 24 Std. möglich. Bis dahin bleiben die Platten in einer feuchten Kammer stehen. Wenn keine feuchte Kammer vorhanden ist, so kann diese durch Einlegen eines angefeuchteten Zellstoffstückes in den Plattenraum zusammen mit dem gutschließenden Plattendeckel erreicht werden. Nach 48 Std. sind die Immunpräzipitate in der Gelschicht deutlich ausgebildet, so daß sie leicht ausgemessen werden können. Die dafür vorgesehenen Meßschablonen (Behringwerke Marburg) bieten eine ausreichende Genauigkeit.

Für Serum - Albumin läßt sich ein Normbereich von 3500 - 5500 mg % angeben. Die Schwierigkeit bei der Auftragung der Proben besteht darin, eine Verdünnung herzustellen, die dem Meßbereich der M - Partigen - Platten von 50 - 600 mg % entspricht, und trotzdem genügend Substrat für die Enzymbestimmung liefert. Eine Aufschwemmung des Sekrets in 2,5 ml Boratpuffer pH 8,0 brachte die besten Ergebnisse.

V. Aufstellung der Eichkurve zur quantitativen Albuminbestimmung

Als Standardlösung wurde das stabilisierte Standard - Human - Serum verwendet, wobei 5260 mg Albumin in 100 ml SHS enthalten sind (Behringwerke Marburg). Es wurde folgendermaßen verdünnt:

1 : 40 1 : 20 1 : 10

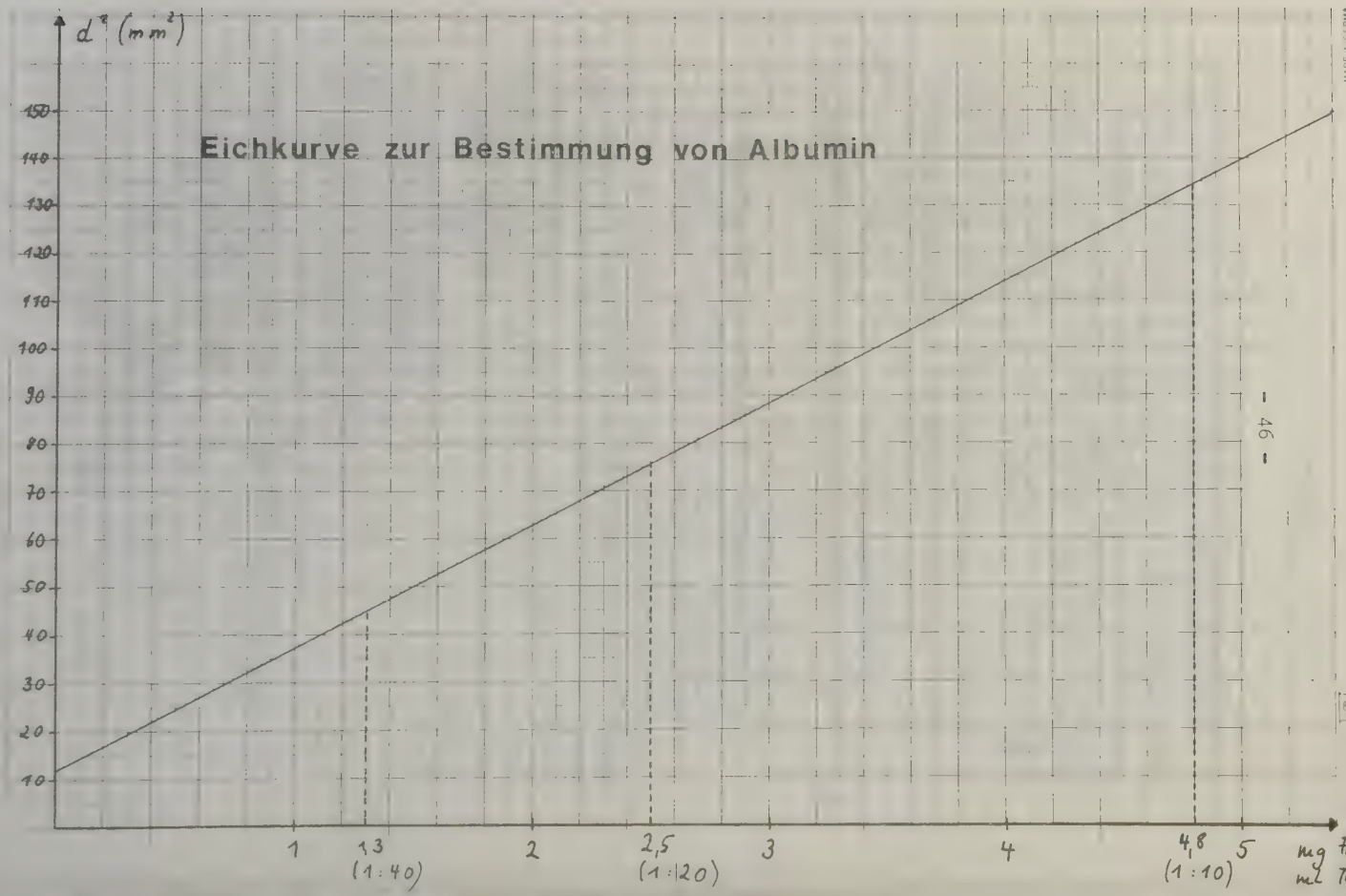
Verdünnungsmittel: physiologische Kochsalzlösung.

Dabei werden jeweils 14 μl bzw. 10 μl pro Verdünnung aufgetragen und der Durchmesser der Präzipitatkreise nach 48 Std. ausgemessen. Dabei ergaben sich folgende Meßergebnisse für die Aufstellung der Eichkurve:

1. Für die Verdünnung 1 : 40
   35 mm^2 entsprechen 1,3 mg Albumin pro ml Testansatz
2. Für die Verdünnung 1 : 20
   75 mm^2 entsprechen 2,5 mg Albumin pro ml Testansatz
3. Für die Verdünnung 1 : 10
   135 mm^2 entsprechen 4,8 mg Albumin pro ml Testansatz

In dem Koordinatensystem zur Aufstellung der Eichkurve werden auf der Abszisse die Albumin - Mengenwerte und auf der Ordinate die entsprechenden quadrierten Präzipitatringdurchmesser aufgetragen.

Als Funktion zwischen beiden Werten erhält man eine Gerade.


Eichkurve zur Bestimmung von Albumin
d² (mm²)
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
1
1,3
(1:40)
2
2,5
(1:20)
3
4
4,8
(1:10)
5
mg Hb/
ml Test-

F. Zusammenfassung

1. Zur Untersuchung gelangten Nasensekrete von Patienten ohne pathologische Veränderung der Nasenschleimhaut und der oberen Luftwege. Dabei wurde im Nasensekret ein Nachweis vom Vorhandensein einer Reihe von Enzymen des Intermediärstoffwechsels, welche in der inneren Medizin zur Diagnostik herangezogen werden, durchgeführt. Es handelte sich um eine vergleichende Bestimmung der in Serum und Nasensekret vorkommenden Enzymaktivitäten LDH, GOT, GPT, CPK, saure und alkalische Phosphatase, GLDH, LAP und α - HBDH.

2. Die Bestimmung von Enzymen im Serum führt direkt zu eindeutigen Ergebnissen, da Enzymeinheiten in absoluten Einheiten pro Volumeneinheit angegeben werden können. Die Sekretmenge und der Gehalt an Sekretinhaltstoffen variieren naturgemäß stark. Da sich jedoch in allen Sekreten Serumalbumin findet, wurde die in der jeweiligen Sekretlösung festgestellte Enzymmenge auf die vorhandene Albuminmenge bezogen. Die gewählte Bezugsgröße erscheint deshalb geeignet, da auch eine Erhöhung der Leitenzyme bei bestimmten interen Erkrankungen weitgehend unabhängig vom Albumingehalt ist.

3. Die Albuminbestimmung im Nasensekret erfolgte nach der Methode von Mancini durch Diffusion des Antigens in antikörperhaltiges Gel. Nach dem Ausmessen des jeweils entstandenen Präzipitatringdurchmessers konnte die Albuminmenge auf der mit Standard - Human - Serum aufgestellten Eichkurve direkt abgelesen werden.

4. Die im Photometer abgelesenen Werte der einzelnen Enzymaktivitäten im Nasensekret mußten auf die einem Milligramm entsprechenden Aktivitäten umgerechnet werden.

5. Nach dem Nachweis vom Vorhandensein der Enzyme des Intermediärstoffwechsels im menschlichen Nasensekret und der anschließenden Ermittlung ihrer Normbereiche konnte eine vergleichende Untersuchung von Serum und Nasensekret bei Patienten mit deffinierten Erkrankungen angeschlossen werden. Dabei handelte es sich bei diesen Patienten um Fälle von akuter Hepatitis, Verschlußikterus bei Cholelithiasis, Prostatacarcinom und Herzinfarkt.

6. Wie die Vergleichsergebnisse der Untersuchung der einzelnen Enzymaktivitäten im Serum und entsprechendem Nasensekret bei bestimmten internen Erkrankungen zeigen, liegen die Aktivitäten im Nasensekret in allen Fällen innerhalb der ermittelten Normwerte, während die Serumwerte ein Vielfaches der Norm übersteigen. Diese einfache Methode erlaubt festzustellen, daß die im Nasensekret vorkommenden Enzyme des Intermediärstoffwechsels unter physiologischen Bedingungen überhaupt nicht oder nur zu einem ganz geringem Teil durch die Transsudation aus dem Serum in das Sekret gelangen. Die nachweisbaren Enzyme im Nasensekret müssen demnach aus den Epithelzellen der Nasenschleimhaut direkt durch Exsudation in das Sekret gelangen.

G. Literaturverzeichnis

1. Naumann, H. H., Vortrag vor der Deutschen Gesellschaft der HNO - Ärzte, XXIX. Jahresversammlung, 1958

2. Naumann, H. H., Intravitalbeobachtungen an der Nasenschleimhaut. Archiv für Ohrenheilkunde, 173. Band, S. 127 - 131 (1958)

3. Breuninger, H., Feine, U., Über die Diffusion von Stoffen verschiedener Größe und Löslichkeit im Nasenschleim. Arch. Klin. Ohr.-, Nas.- und Kehlk. - Heilk. 187 (1966) 622

4. Breuninger, H., Feine, U., Über die Aufnahme markierter Glukose von Schleimhäuten in Nase, Mund und Mittelohr. Arch. Klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk. - Heilk. 191 (1968) 662

5. Münzel, M., Hochstrasser, K., Tierexperimentelle Untersuchungen zur Aufnahme von Aminosäuren nach Applikation auf die Nasenschleimhaut. Z. Laryng. Rhinolog. 52 (1973) 144

6. Naumann, W. H., Münzel, M., Resorptionsmessungen an der Nasenschleimhaut des Kaninchens. Arch. Klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk. - Heilk. 191 (1968) 665

7. Kupfer, G., Geyer, G., Permeabilitätsstudien an Basalmembran - Bindegewebspräparaten von der Nasenschleimhaut weißer Mäuse. Anat. Anzeiger 122, 281 - 287 (1968)

8. Melon, J., Beitrag zum Studium der sekretorischen Aktivität der Nasenschleimhaut, Charakteristika der Permeabilität des Epithels, acta oto-rhino-laryng. belg. 22, 5 - 244 (1948)

9. Messerklinger, W., Die Schleimhaut der oberen Luftwege im Blickfeld neuerer Forschung S. 59

10. Ingelstedt, S., Ivstam, B., The source of nasal secretion in the normal condition. Acta oto-laryng. (Stockh.) 37 (1949) 446

11. Schmidt, E., Schmidt, F. W., Die Bedeutung der enzymatischen Analyse in der Medizin. In: Methode der enzymat. Analyse (Hersg. H. U. Bergmayer) Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1970, 6 - 30

12. Mancini, F., Carbonara, S. O., Heremans, J. F., Immunochemical Quantitation of Antigen by Single Radial Immunodiffusion. Immunochem. 2 (1965) 235

13. Zeitschrift für klin. Chemie und klin. Biochemie. Sonderdruck Heft 3, S. 113 - 122 (1968)

14. Wroblewski, F., et al. Proc. Soc. exp. Biolog. Med. 90, 210 (1955)

15. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochemie 8, 658 (1970); 10, 182 (1972)

16. Caband, P. G., Wroblewski, F., v. Ruggiero, Amer. J. clin. Pathol. 30, 234 (1958)

17. Bergmayer, U., Methoden der enzymat. Analyse, Bd. I, S. 770 bzw. 786 (1974)

18. Cohen, P. P. in Colowick, S. P. und Kaplan, N. O., Methods in Enzymology. Acad. Press, New York 1955, Bd. II, S. 178

19. Wroblewski, F., La Due, J. S., Proc. soc. exp. Biol. Med. 91, 569 (1956)

20. Oliver, J. T., Biochem. J. 61, 116 (1955)

21. Szasz, G., et al., Dtsch. med. Wochenschr. 95, 829 (1970)

22. Tanzer, M. L., Gilvary, C., J. biol. Chem. 234, 3201 (1959)

23. Rosalki, S. B., et al., Nature (London) 188, 1110 (1960)

24. Elliott, B. A., et al., Clin. Sci. 24, 343 (1963)

25. Richterich, R., et al., Schweiz. med. Wschr. 92, 781 (1962)

26. Richterich, R., et al., Schweiz. med. Wschr. 92, 1496 (1962)

27. Walter, S. J., et al., Ärztl. Lab. 10, 220 (1964)

28. Fishman, W. H., et al., J. biol. Chem. 200, 89 (1953)

29. Schmidt, E. u. F. W., Med. Hochschule Hannover, pers. Mitt.

30. Bessey, O. A., et al., J. biol. chem. 164, 321 (1946)

31. Nagel, W. F., Willig u. Schmidt, F. H., Klin. Wschr. 42, 447 (1964)

32. Jösch, W. u. Dubach, U. C., Z. klin. Chem. 5, 59 (1967)

33. Schmidt, E. in Bergmayer, H. U., Methoden der enzym. Analyse, Verlag Chemie Weinheim, Bd. I, S. 607, 2. Aufl. 1970

34. Schmidt, E. u. F. W., Enzym. biol. clin. 3, 1 (1963)

Meinem verehrten Doktorvater sei hiermit herzlich gedankt für die Überlassung des Themas und für die großzügige Förderung, die er meiner Arbeit in jeder Hinsicht hat zukommen lassen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann als dem Direktor der HNO - Klinik für den Arbeitsplatz, den er mir in seiner Klinik zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin danke ich ganz besonders Frau Dr. K. Schorn für die hilfreiche Unterstützung und die wertvollen Hinweise bei der Durchführung dieser Arbeit.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 9. Juni 1951 als Tochter des Kaufmanns Dr. jur. Richard Otto Pasemann und seiner Frau Barbara in München geboren.

1957–61	Besuch der Volksschule an der Rotbuchenstraße in München
1961–70	Besuch des Theodolindengymnasiums in München
1970–76	Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1. März 1976	Beendigung des zahnmedizinischen Staatsexamens
24. Okt. 1976	Heirat mit dem Wirtschaftsingenieur Dipl.-Ing. Dr. Otto Waldmann.